

201328064A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス

総合研究事業

乱用薬物の鑑別法に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

(H25-医薬-一般-019)

研究代表者 内山 奈穂子

平成 26 (2014) 年 3 月

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

乱用薬物の鑑別法に関する研究

目 次

I. 総括研究報告書		
乱用薬物の鑑別法に関する研究		
内山 奈穂子	1
II. 分担研究報告書		
1. 法規制薬物(植物を含む)の分析と鑑別に関する研究		
内山 奈穂子・花尻(木倉) 瑠理		
アミノアルキルインドール(ナフトイルインドール)構造を有する麻薬の分析法について		
花尻(木倉) 瑠理	11
麻薬類の TLC 分析による識別法		
花尻(木倉) 瑠理	21
簡易薬物スクリーニングキットを用いた法規制薬物(合成カンナビノイド)の識別法の検討		
内山 奈穂子	29
2. 法規制薬物の代謝と分析及び鑑別に関する研究		
花尻(木倉) 瑠理		
“脱法ハーブ”喫煙ヒト生体試料中違法ドラッグ成分の定量分析		
花尻(木倉) 瑠理	39
固相分散抽出法によるヒト血液中合成カンナビノイド JWH-018 の分析法の検討		
阿久津 守	51
3. コンピュータモデリングによる法規制薬物の代謝物予測に関する研究		
出水 庸介		
コンピュータモデリングによる合成カンナビノイドの代謝物予測に関する研究		
出水 庸介	61
4. DNA を用いた法規制植物の識別法に関する研究		
緒方 潤		
法規制植物の LAMP 法を用いた簡易検出法の検討		
緒方 潤	65
大麻種子 1 粒からのマイクロサテライトマーカーを用いた識別法の検討		
緒方 潤	75

5. 遺伝子情報を利用したケシ属植物の鑑別に関する研究
河野 徳昭

..... 81

乱用薬物の鑑別法に関する研究

研究代表者:内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

研究要旨:平成24年度以降、「指定薬物」から積極的な「麻薬」への指定が進み、同年度から平成26年1月までに、指定薬物のうち合成カンナビノイド及びカチノン系化合物を含む15化合物が新たに麻薬として規制された。従って、これら新規麻薬を含む麻薬とその他の薬物(指定薬物及び未規制化合物)を迅速且つ正確に識別することは司法的な観点からも非常に重要である。また、大麻やケシ等の法規制植物に関しては、各植物における種や栽培品種の簡便で厳密な鑑別法の確立が、有効な規制を行うために重要な課題となっている。本研究では、法規制薬物の中で、麻薬・向精神薬取締法及びあへん法など関連4法で厳しく規制される薬物及び植物、さらに今後これらの法律により規制される可能性の高い薬物及び植物について、迅速かつ効果的な分析と鑑別を目的として、以下の研究を行った。

法規制薬物の分析に関しては、近年麻薬として規制された合成カンナビノイド 4 化合物及びそれらと類似の構造を有する指定薬物 6 化合物を対象として、呈色試験、TLC、GC/MS、LC/MS 等による試験法をまとめた。また、近年麻薬に指定された化合物及びその構造類似麻薬を中心に、合計 43 化合物を対象とし、TLC 分析を行い、Rf 値及び呈色試験による発色を確認した。これら麻薬類の TLC 分析データと共に、GC-MS や LC-PDA-MS などの測定データを整備・蓄積することで、麻薬類の識別法の有用なデータとした。また、主に naphthoylindole 型合成カンナビノイドを検出対象薬物とした簡易スクリーニングキット(イムノアッセイキット)を用いて、合成カンナビノイド 38 化合物について検討した。その結果、現在麻薬である naphthoylindole 型 5 化合物は全て検出可能であり、例外はあるものの、概ね naphthoylindole 型合成カンナビノイドに特化した検出が可能であり、また、“脱法ハーブ”製品中の薬物も検出が可能であった。従って、本薬物スクリーニングキットは、簡易検出法として有用であると考えられ、今後、乱用薬物の取り締まりの現場や救急医療機関などにおける活用の可能性が示された。

法規制薬物の生体試料分析に関しては、“脱法ハーブ”が関与したと考えられる救急搬送 1 事例において、患者が所持していた製品から、合成カンナビノイド 5F-QUPIC 及びカチノン系化合物 α -PHPP が検出された。患者血清試料からは、未変化体 5F-QUPIC、 α -PHPP と共に、5F-QUPIC 3-carboxyindole 体が検出された。5F-QUPIC は、平成 24 年度後半から 25 年度前半に違法ドラッグ製品中から最も多く検出され健康被害も報告された化合物であり、既に指定薬物として規制されているが、今後もその流通・乱用を注視していくべき化合物であると考えられる。また、血液等生体試料の前処理として、新たに開発された固相分散抽出法は、血中合成カンナビノイド JWH-018(麻薬)にかかる前処理法として有用であることが示唆された。

さらに、法規制薬物の鑑別法におけるコンピュータシミュレーションの妥当性について検証することを目的し、CB1 受容体のホモロジーモデル構築、CB1 受容体と CB1 リガンド(Δ^8 -THC、JWH-018)間のドッキングシミュレーションによる結合様式の解析を行った。その結果、CB1 受容体のリガンド結合

領域は広い疎水性空間を持っているため、リガンドは複数のコンフォメーションで結合することが示唆された。

植物関係では、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)を用いた簡便な法規制植物の鑑別法として、アサ、ケンDNAを用いた目視判定法の検討を行った。本法は高い特異性を示し、通常のPCRによる結果と完全に一致した。従って、本法は短時間目視判定スクリーニング法の有効な手段の一つであると示唆された。また、アサの産地識別法を目的として、国内栽培種等を用いて、マイクロサテライトマーカーを用いた判別分析の条件検討を行った。また、法規制植物ケン属のモルヒナンアルカロイド類の生合成機構に関する情報整備を目的として、オニゲシ、ケン及びこれらの交配種を用いた次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析並びに、ESTライブラリーの作製に着手した。

以上、本研究は、厚生労働省の法規制薬物行政と取り締まりに直接的に貢献する内容であり、ひいては、国民の健康・危機リスクを軽減させるものと考えられる。

【分担研究者】

花尻(木倉) 瑠理:国立医薬品食品衛生研究所
生薬部室長

緒方 潤:国立医薬品食品衛生研究所
生薬部主任研究官

出水 庸介:国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部室長

河野 徳昭:独立行政法人医薬基盤研究所
薬用植物資源研究センター筑波研究部
主任研究員

【協力研究者】

阿久津 守:関東信越厚生局麻薬取締部
鑑定課鑑定課長

杉江 謙一:関東信越厚生局麻薬取締部
厚生労働技官

吉松 嘉代:独立行政法人医薬基盤研究所
薬用植物資源研究センター筑波研究部
育種生理研究室長

林田 真喜子:日本医科大学法医学教室

河村 麻衣子:国立医薬品食品衛生研究所
生薬部

A. 研究目的

平成 24 年度から、依存性等の中樞毒性が認められた「指定薬物」について積極的な「麻薬」への指定が進み、同年度から平成 26 年 1 月までに、

指定薬物のうち合成カンナビノイド及びカチン系化合物を含む 15 化合物が新たに麻薬として規制された。従って、特にこれら新規規制化合物を含む麻薬とその他の薬物(指定薬物及び未規制化合物)を迅速且つ正確に識別することは司法的な観点からも非常に重要である。分析的な面で考えると、麻薬や覚せい剤の使用罪に対応するため、生体による代謝物を事前に明らかにして、これらの化合物についての的確に分析できることが重要となる。また、法規制薬物の場合、現場では様々な使用形態があるため、それぞれの使用形態に対応した分析法が重要となる。法規制植物に関しては、大麻では栽培品種により含有成分が大きく異なることが知られている。ケン属植物では、一般的に植物の鑑定は難しいため、鑑賞用に誤って違法けしを栽培してしまう事例もある。従って、各植物における種や栽培品種の、簡便で厳密な鑑別法の確立が有効な規制を行うために重要な課題となっている。

研究代表者らは、これまで継続的に法規制薬物及びその代謝物に関する研究を行っており、生体試料(尿、毛髪等)分析による麻薬化合物の摂取識別法を明らかにしてきた。また、植物の鑑別に関する研究では、大麻種子の発芽能力の迅速鑑別法を確立し、鑑定官に対する研修指導を行うなど、取り締まりの現場に直接貢献する研究

を行っている。この様に、本研究は、現在厳しく法規制されている薬物及び今後同様に法規制される可能性の高い薬物について、監視・指導麻薬対策課、地方厚生局麻薬取締部等と連絡を取り合いながら現場の諸問題に対応できるように、実態に即した研究を行う点に特徴があり、日本の法規制薬物行政に直接的に貢献することを目的としている。

そこで、本研究では、以下の検討を行った。

近年麻薬に指定された化合物を中心とした麻薬と他の薬物(指定薬物や未規制化合物)との識別のために、各薬物について、呈色試験、TLC、簡易薬物スクリーニングキット(イムノアッセイ法)、GC/MS、LC/MS等の基礎的科学データの収集・整備を行った。また、法規制薬物の生体試料分析に関しては、薬物による急性中毒が原因と考えられる救急搬送事例について、LC-MS/MSを用いた血清試料中薬物分析を検討した。また、麻薬取締部の協力のもと、麻薬成分のうち、合成カンナビノイドの生体試料中の迅速検出を目的として、血液等試料の前処理として行われる固相抽出法のうち、固相分散抽出法での検討を行った。さらに、乱用薬物と特異的受容体との結合様式予測と活性との相関評価、また、その薬物の代謝酵素とのコンピュータモデリングによる代謝物予測を目的として、合成カンナビノイドについて検討を行った。

植物関係では、Loop-Mediated Isothermal Amplification(LAMP)を用いた簡便な法規制植物の鑑別法として、アサ、ケシ DNA を用いた目視判定法の検討を行った。また、アサの産地鑑別法を目的として、国内栽培種等を用いて、マイクロサテライトマーカーを用いた判別分析の条件検討を行った。また、遺伝子情報を利用した法規制植物ケシ属植物の植物種間、品種間、系統間の迅速鑑別法の確立を試みた。

B. 研究方法

1. 法規制薬物(植物を含む)の分析と鑑別に関

する研究

1-1. アミノアルキルインドール(ナフトイルインドール)構造を有する麻薬の分析法について

ナフトイルインドール骨格を有するカンナビノイド受容体作動薬のうち、2012年及び2013年度に麻薬として規制された4化合物:JWH-122, AM2201, MAM-2201及びそれらと類似の構造を有する指定薬物6化合物の計10化合物を対象として、薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー/質量分析、高速液体クロマトグラフィー/質量分析による試験法をまとめた。

1-2. 麻薬類の TLC 分析による識別法

近年麻薬に指定された化合物及びその構造類似麻薬を中心に、合成カンナビノイド類(7化合物)、カチノン類(麻薬8化合物、向精神薬2化合物)、フェネチルアミン類(覚せい剤2化合物、覚せい剤原料1化合物、麻薬13化合物)、トリプタミン類(5化合物)、ピペラジン類及びその他(麻薬4化合物、向精神薬1化合物)、合計43化合物を対象とし、2種の展開溶媒を用いてTLC分析を行い、各Rf値を確認した。またUV検出及び4種類の検出試薬(呈色試薬:マルキス試薬、ニンヒドリン試薬、ドラーゲンドルフ試薬、ヨウ化白金酸カリウム溶液)による発色を確認し、色調の差異を検討した。

1-3. 簡易薬物スクリーニングキットを用いた法規制薬物(合成カンナビノイド)の識別法の検討

主に naphthoylindole 型合成カンナビノイドを検出対象薬物とした簡易スクリーニングキット(イムノアッセイキット)Drug check® K2/Spice Testを用いて、12種類の異なる骨格の合成カンナビノイド38化合物(麻薬:7化合物、指定薬物(予定含む):25化合物、未規制:6化合物、うち naphthoylindole 型:13化合物)及び Δ^9 -THCの計39化合物について、検出の有無を検討した。本キットは、本来尿試料中の対象薬物の代謝物の検出を目的として用いるが、本研究では、化合物本体について本キットを用いた検出が可能であるかを検討

した。

2. 法規制薬物の代謝と分析及び鑑別に関する研究

2-1. “脱法ハーブ”喫煙ヒト生体試料中違法ドラッグ成分の定量分析

“脱法ハーブ”が関与したと考えられる救急搬送1事例において、生体試料中含有薬物の検討を行った。また、搬送患者が所持していた“脱法ハーブ”製品(乾燥植物細片混合物)の抽出物をGC-MS及びLC-MSで測定した。生体試料は、搬送後6日間にわたり血清試料(N-1~N-6)を採取したものであり、患者はその後死亡した。血清試料は、“脱法ハーブ”製品の分析結果から検出が予想される化合物を考慮し、未変化体及び代謝物計9化合物を分析対象とし、LC-MS/MSMRMでスクリーニング分析を行うと共に、未変化体及び4種類の代謝物については定量分析を行った。

2-2. 固相分散抽出法によるヒト血液中合成カンナビノイドJWH-018の分析法の検討

麻薬に指定されている合成カンナビノイド: JWH-018をヒト血液に添加し、試料の前処理として固相分散抽出法(SPDE法)法を選択し、試験手順について検討した。使用する固相担体、溶出溶媒、血液の除タンパク処理等についてそれぞれ検討を行った。

3. コンピュータモデリングによる法規制薬物の代謝物予測に関する研究

3-1. コンピュータモデリングによる合成カンナビノイドの代謝物予測に関する研究

すでにX線結晶構造が明らかとなっているGPCRであるロドプシン(PDB:1F88)をテンプレートとして、カンナビノイドの特異的受容体であるCB1受容体の立体構造をホモロジーモデリングにより構築した。さらに、Site Finderを用いてモデル構築したCB1受容体のリガンド結合領域を検出し、CB1リガンド(JWH-018および Δ^8 -THC)とのドッキングシミュレーション(力場;MMFF94X)を行うことで、CB1受容体に対するリガンドの結合

様式の解析を行った。

4. DNAを用いた法規制植物の識別法に関する研究

4-1. 法規制植物のLAMP法を用いた簡易検出法の検討

実験試料は、(独)医薬基盤研究所・薬用植物資源研究センター筑波研究部から分譲された大麻種子(トチギシロ)およびケシ種子(トルコ)、違法ドラッグ製品(2013年度分析品(植物片))を使用した。*Cannabis sativa* および *Papaver somniferum* 各々の特異的DNA塩基配列中の6ヶ所をターゲットとして、プライマー4種(PCR法は通常2種)を設計し、等温(PCR法は温度変化が必要)での標的DNAの「増幅」が可能であるLoop-Mediated Isothermal Amplification(LAMP)法を用い、「検出」は、反応溶液中のHydroxynaphthol Blue(HNB)を用いた比色検出法を採用し、法規制植物の簡易検出法を検討した。

4-2. 大麻種子1粒からのマイクロサテライトマーカを用いた識別法の検討

実験材料として基盤研・薬植セ・筑波にて系統保存されているメキシコ産系統種子(M)および日本国内繊維用栽培種トチギシロ(T)種子を用い、各種子1粒を用いDNAを抽出・精製した。反応溶液として、酵素にはEx Taq Hot start version(Takara)0.1 μ L、PCR反応試薬には、Ampdirect plus(Shimadzu)5 μ L、蛍光(FAM(青)or HEX(緑))プライマー2 pmol、各M13(-21)連結マーカ1 pmol、各GTTT連結マーカ2.5 pmol、DNA溶液1 μ Lとし、全量10 μ LでPCR反応を行った。反応溶液をHi-Di Formamide(Thermo Fisher Scientific)にて5倍希釈し、その1 μ LをHi-Di 20 μ L + 500 ROX dye Size Standard(Thermo Fisher Scientific)0.5 μ Lに添加、95°C 3min加熱後、急冷し解析サンプルとした。ABI Prism 3100-Avant Genetics Analyzer(ABI)を使用し、GeneMapper v4.1によるマイクロサテライト解析を行った。

5. 遺伝子情報を利用したケシ属植物の鑑別に関する研究

医薬基盤研究所・薬用植物資源研究センターで作出・維持されているオニゲシ、ケシ及び、アルカロイド生産能に変異を生じたこれらの植物間の交配種等を含む無菌培養物、合計9系統を材料として、total RNA調製を行った。RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を使用し、得られたtotal RNA溶液の2 µLをNanodrop ND1000による濃度及び吸光スペクトルの解析に、また、3 µLをアガロース電気泳動解析に供し、品質の確認を行った。これらのtotal RNAは-80℃で保存した。これらを材料に、トランスクリプトーム解析は、かずさDNA研究所において次世代シーケンサーHiSeq1500 (illumina)を用い実施した。

C. 研究結果・考察

1. 法規制薬物(植物を含む)の分析と鑑別に関する研究

1-1. アミノアルキルインドール(ナフトイルインドール)構造を有する麻薬の分析法について

TLC分離において、大麻成分 Δ^9 -THCの分離に汎用される展開溶媒:トルエン-ヘキサン-ジエチルアミン(25:10:1)を用いた場合、ナフトイルインドール類のスポットがテーリングを起こした。そこで、4種類の展開溶媒を用いて検討を行った。いずれの展開溶媒でも、JWH-018とJWH-122、AM-2201とMAM-2201など、構造が極めて類似している化合物については、明確な分離が困難であったが、ヘキサン-酢酸エチルを用いた展開溶媒においては、比較的良好的な結果が得られた。一方、検出に関しては、いずれの化合物もUVで比較的高感度に検出が可能であった。また、10%硫酸噴霧後加熱する方法及びマルキス試薬においても、UVと同等に高感度の検出が可能であった。今回検討した10化合物においては、それぞれの呈色試薬で、特徴的な色調を認めることはできなかった。なお、カンナビノイド特異的な検出試薬Fast Blue BBでは、今回検討し

た全てのナフトイルインドール類で発色が認められなかった。

GC-MS分析に関しては、微極性キャピラリーカラムDB-5MSを用いた分離条件で、分析対象とした10種類のナフトイルインドール類は、一部を除きおおむね良好に分離した。JWH-122及びJWH-122 N-(4-pentenyl) analogについては、DB-5MSでは良好的な分離は困難であったが、DB-1MSなどの無極性カラムを用いれば、分離が可能であった。今回分析対象としたナフトイルインドール類は、いずれもGC-EI-MS分析において、ベースピークが分子イオン[M⁺]であり、カルボニル由来のヒドロキシラジカルが脱離した[M⁺-17]等、構造由来のフラグメントイオンが多数検出された。

LC-MS分析に関しては、ODSカラムを用いた、ギ酸-アセトニトリルを移動相としたグラジエント分析条件において、分析対象10化合物のピークトップ分離が可能であった。ナフトイルインドール類は脂溶性が高く、ODSカラムに強く保持されるため、グラジエント分析が推奨された。いずれの化合物も、本分析条件で、プロトン付加分子が主に検出された。また、UVスペクトルにおいて、312 nm付近に吸収極大を示し、240から250 nm付近に小さな吸収の肩を示したが、4-MeO-AM2201については吸収の肩は示さなかった。

1-2. 麻薬類のTLC分析による識別法

合成カンナビノイド類7化合物の分離については、アルカリ溶液を添加する既報の試験法では、R_f値が大きくなり分離が悪くなる等の短所があったが、今回検討したアルカリ無添加の展開溶媒であるヘキサン:酢酸エチル(3:1)がより良好的な分離を示した。カチノン系10化合物の分離には、従来、覚せい剤等の分離に用いられている展開溶媒:メタノール・28%アンモニア水(100:1.5)では、R_f値が大きくなる等の短所があったが、今回提示したヘキサン:アセトンまたは酢酸エチル:トリエチルアミン混合展開溶媒がより良好に分離したため、分析に有用であると考えられた。トリプタ

ミン類 5 化合物についても、今回提示したヘキサン:アセトンまたは酢酸エチル:トリエチルアミン混合展開溶媒により良好に分離した。

フェネチルアミン類の一部及びピペラジン類の分離に関しては、従来法であるメタノール・28%アンモニア水(100:1.5)を用いて展開を行う方が良いと考えられた。フェネチルアミン類のうち、2,5-Dimethoxyphenethylamine 構造を有する幻覚薬(2C-I など 7 化合物)については、ODS 系の逆相 TLC を用いることにより、分離の改善が見られた。また、検出法として用いた紫外線照射及び呈色試薬については、各化合物類により UV 吸収及び発色の差異が認められ、UV 吸収が弱く確認が困難な化合物に対して、検出に有用であった。

1-3. 簡易薬物スクリーニングキットを用いた法規制薬物(合成カンナビノイド)の識別法の検討

今回検討した 12 種類の異なる骨格の合成カンナビノイド 38 化合物(うち、naphthoylindole 型: 13 化合物)及び Δ^9 -THC の計 39 化合物のうち、naphthoylindole 型 10 化合物、その他 2 化合物の計 12 化合物が陽性であった。このうち、現在麻薬として規制されている naphthoylindole 型 5 化合物(JWH-018, JWH-073, AM-2201, MAM-2201, JWH-122)は全て検出可能であった。また、例外はあるものの、概ね naphthoylindole 型合成カンナビノイドに特化した検出が可能であると考えられた。また、植物系違法ドラッグ(脱法ハーブ)製品抽出溶液中の薬物も検出が可能であった。

従って、本薬物スクリーニングキットは、主に naphthoylindole 型合成カンナビノイドの簡易検出法として有用であると考えられた。

2. 法規制薬物の代謝と分析及び鑑別に関する研究

2-1. “脱法ハーブ”喫煙ヒト生体試料中違法ドラッグ成分の定量分析

始めに、救急搬送患者が所持していた”脱法ハーブ”製品(乾燥植物細片混合物)の抽出物を

GC-MS 及び LC-MS で測定した結果、合成カンナビノイド 5F-QUPIC が主に検出され、カチノン系化合物 α -PHPP も検出された。LC-MS 分析により定量を行った結果、製品中の α -PHPP 及び 5F-QUPIC は、それぞれ 14.3 ± 1.2 mg/g 及び 61.2 ± 1.2 mg/g であり、5F-QUPIC が主含有違法ドラッグ成分であった。

次に、救急搬送後 6 日にわたって採取された血清試料を分析した。その結果、カチノン系化合物である α -PHPP は、未変化体が 6 日間にわたって 0.04 - 0.11 ng/mL と低濃度検出された。しかし、予測された代謝物について、MRM 分析において相当するピークは検出されなかった。一方、合成カンナビノイド 5F-QUPIC においても、未変化体が 6 日に間にわたり 0.30 - 1.44 ng/mL 検出されたが、代謝物は 5F-QUPIC carboxyindole がわずかに 1 日目の試料(N-1)から検出されたのみであった。未変化体 5F-QUPIC は、1 日目が最も高濃度(1.44 ng/mL)検出され、4 日後には 0.23 ng/mL まで減少したが、5 日後には再び 0.82 ng/mL まで上昇した。なお、ヒト血清試料(N-1,2,3)にグルクロニダーゼ処理を行い検討したが、処理前後で検出される化合物量に差は認められなかった。今回分析したヒト血清試料については、採取してからかなりの時間冷蔵庫(4°C)保存をしていたため、分析結果が、必ずしも実際の薬物動態を反映しているとは言い難い。しかし、尿中では困難な合成カンナビノイドの未変化体の検出が、血清試料では可能であった。5F-QUPIC は、平成 24 年度後半から 25 年度前半に違法ドラッグ製品中から最も多く検出され健康被害も報告された化合物であり、JWH-018 よりも約 400 倍強い CB_1 受容体親和性が認められている。

2-2. 固相分散抽出法によるヒト血液中合成カンナビノイド JWH-018 の分析法の検討

麻薬に指定されている合成カンナビノイド: JWH-018 をヒト血液に添加し、固相分散抽出法を検討した。その結果、本抽出法に使用する固相担体は、Oasis[®] HLB(Waters)を選択し 10 mg が

適切な量であり、溶出液は、酢酸エチルが最も回収率が高く、操作性も優れていた。また血液の前処理では、最速方法として全血をそのまま使用することも可能であったが、血液を除タンパクし、溶媒留去した上清を使用することで夾雑物が減少し回収率が向上した。以上の結果、同法により血液から迅速に試料が調製でき、分析対象物質については比較的高い回収率が得られたことから、当該試験の前処理法として固相分散法の有用性が示唆された。

3. コンピュータモデリングによる法規制薬物の代謝物予測に関する研究

3-1. コンピュータモデリングによる合成カンナビノイドの代謝物予測に関する研究

CB1 受容体のテンプレートとして用いたロドプシンと CB1 受容体のシーケンス間の相同性は約 19%であった。また、モデル構築した CB1 受容体の構造はテンプレートとして用いたロドプシン構造と良い一致を示した。次に、このモデル構築を行った CB1 受容体に対して、Site Finder を用いたリガンド結合領域の検出を行い、続いて CB1 リガンド (JWH-018 および Δ^8 -THC) とのドッキングシミュレーションを行った。その結果、JWH-018, Δ^8 -THC 共に、複数のコンフォメーションで CB1 受容体に結合することが示唆されたが、その中でも 2 種類の配座が安定構造として得られた。

4. DNA を用いた法規制植物の識別法に関する研究

4-1. 法規制植物の LAMP 法を用いた簡易検出法の検討

Cannabis sativa および *Papaver somniferum* 各々について設計した LAMP プライマーを用いて、LAMP による検出を検討した。その結果、大麻及びケシそれぞれの DNA 増幅(酵素反応)により、反応溶液中の HNB の色調が変化した。従って、反応産物によって色調が変化すること、*C. sativa*, *P. somniferum* に各々に特異的に反応していることが示唆された。次に、平成 25 年度分析違法ドラッグ製品を用いた DNA 塩基配列解析の

結果、いずれの製品も *C. sativa* および *P. somniferum* は検出されず、今回の LAMP による結果でも同様であった。これら製品は色調に変化が見られず、ポジコンである、大麻およびケシには色調の変化(DNA 検出)が見られた。また、これまでの違法ドラッグ製品の DNA 塩基配列解析において *C. sativa* および *P. somniferum* 由来 DNA が検出されないサンプルで HNB の色調が変化するものは見られていない(data not shown)。

従って、今回行った LAMP による一連の実験系は、DNA の抽出に 1 時間、調整、酵素反応に 2 時間と、全工程 3 時間程度で検出が可能であり、誤判定もすくないことから、大量生産される“脱法ハーブ”製品中の *C. sativa* および *P. somniferum* 植物体の混入の有無の簡易スクリーニング法として有効な手法であることが示唆された。

4-2. 大麻種子 1 粒からのマイクロサテライトマーカーを用いた識別法の検討

マイクロサテライト解析を行った結果、今回用いた既報のプライマー(12 種)では、トチギシロ系統内で 6 種のプライマーが同一の多型を示し、メキシコ系統内で 4 種のプライマーが同一の多型を示した。また、トチギシロとメキシコ産系統で同一の多型を示したのは 1 種のマーカーのみであった。今回、日本国内で、部分的に隔離栽培された系統保存用の大麻 2 種を用い、その遺伝的多様性を調査し、日本国内自生種、栽培種、海外流入種の識別が可能かどうか予備試験的に調査した。各集団内における多型の一致は 5 割程度であるが、集団ごとを比較すると多型に類似性もみられる。この点は、栽培地域の特定や地理的分類の指標にできることが示唆された。今後はより個体数を増やし、有効なマーカーの選抜および新規マーカーの作成を試みる。

5. 遺伝子情報を利用したケシ属植物の鑑別に関する研究

医薬基盤研究所・薬用植物資源研究センターで調製した total RNA は、各種品質確認において、いずれも問題がないことが確認され、かずさ

DNA 研究所においても 2100 Bioanalyzer (Agilent)を用いた品質チェックにおいても問題がないことが確認された。各サンプルについて、HiSeq1500 (illumina) による Paired-End 100 bp の run は正常に完了し、現在、EST データ、contig データ、RPKM 値データ、blastx による機能アノテーションデータの各種データの取得を進めている。本研究結果は、オリパビンの生合成に関わる基盤情報を整備する上で重要となる、生合成酵素遺伝子群の網羅的な発現遺伝子情報を取得するため、センターで作出・維持されている 9 系統を材料として、これらのアヘンアルカロイド生産能の異なる植物試料群の発現遺伝子群の比較解析を行うことにより、オリパビン等のアヘンアルカロイドの生合成制御に関する新たな知見が得られるものと期待される。

D. 結論

本研究は、現在厳しく法規制されている薬物及び今度同様に法規制される可能性の高い薬物の迅速かつ効果的な分析及び鑑別法に関する研究であり、厚生労働省の法規制薬物行政と取り締まりに直接貢献することを目的に以下の研究を行った。

法規制薬物の分析に関しては、近年麻薬として規制された合成カンナビノイド 4 化合物及びそれらと類似の構造を有する指定薬物 6 化合物を対象として、呈色試験、TLC、GC/MS、LC/MS 等による試験法をまとめた。なお、本試験法は、日本薬学会 環境衛生化学部会 薬毒物試験法委員会に「Ⅱ-6. 大麻試験法 6・2 カンナビノイド受容体作動薬 2. アミノアルキルインドール類 (ナフトイルインドール類)」として提出したものであり、委員会において審議された後、日本薬学会第 134 年会において試験法案として提示された。

また、近年麻薬に指定された化合物及びその構造類似麻薬を中心に、合計 43 化合物を対象とし、TLC 分析を行い、R_f 値及び呈色試験による発色を確認した。TLC 分析は、簡単な抽出操作

だけで、比較的短時間で多検体同時処理を行うことが可能である。GC-MS や LC-PDA-MS などの測定データと共に、これら麻薬類の TLC 分析データを整備・蓄積することは、麻薬類の識別法を検討する上で有用であると考えられる。

また、主に naphthoylindole 型合成カンナビノイドを検出対象薬物とした簡易スクリーニングキット (イムノアッセイキット)を用いて、合成カンナビノイド 38 化合物について検討した。その結果、現在麻薬である naphthoylindole 型 5 化合物は全て検出可能であり、例外はあるものの、概ね naphthoylindole 型合成カンナビノイドに特化した検出が可能であり、また、“脱法ハーブ”製品中の薬物も検出が可能であった。従って、本薬物スクリーニングキットは、簡易検出法として有用であると考えられ、今後、乱用薬物の取り締まりの現場や救急医療機関などにおける活用の可能性が示された。

法規制薬物の生体試料分析に関しては、“脱法ハーブ”が関与したと考えられる救急搬送 1 事例において、患者が所持していた製品から、合成カンナビノイド 5F-QUPIC 及びカチン系化合物 α -PHPP が検出された。患者血清試料からは、未変化体 5F-QUPIC、 α -PHPP と共に、5F-QUPIC 3-carboxyindole 体が検出された。5F-QUPIC は、平成 24 年度後半から 25 年度前半に違法ドラッグ製品中から最も多く検出され健康被害も報告された化合物であり、既に指定薬物として規制されているが、今後もその流通・乱用を注視していくべき化合物であると考えられる。

また、血液等生体試料の前処理として、新たに開発された固相分散抽出法を選択し検討を行った。本法は、血中合成カンナビノイド JWH-018 (麻薬)にかかる前処理法として有用であることが示唆された。今後は、他の合成カンナビノイドへの適用を検討すると共に、尿などの生体試料についても検討を行う予定である。

さらに、法規制薬物の鑑別法におけるコンピュータシミュレーションの妥当性について検証する

ことを目的し、CB1 受容体のホモロジーモデル構築、CB1 受容体と CB1 リガンド (Δ^8 -THC, JWH-018) 間のドッキングシミュレーションによる結合様式の解析を行った。その結果、CB1 受容体のリガンド結合領域は広い疎水性空間を持っているため、リガンドは複数のコンフォメーションで結合することが示唆された。

植物関連では、大麻、ケシの DNA 簡易検出法として PCR 装置や電気泳動装置を必要としない LAMP 法を用いた短時間目視判定法を確立した。本法は、各植物種特異的 DNA 配列より 4 種のプライマーを作成し、定温で DNA 増幅をさせるもので、材料取得から全工程 3 時間程度で結果が得られ、誤判定の少ないものであった。また、大麻では産地・系統・来歴などの識別に有効とされ、ヒト DNA 鑑定にも用いられるマイクロサテライトマーカーを用いた DNA 多型解析を、大麻国内栽培種を用いて検討した。同一系統内でのマーカーに対する多型出現率は 50% 程度であった。さらに、ケシ属植物におけるアヘンアルカロイドの生合成制御に関する知見を得るために、次世代シーケンサー HiSeq1500 (illumina) を用い EST データ、contig データ、RPKM 値データ、blastx による機能アノテーションデータの各種データの取得を進めている。

以上、本研究は、厚生労働省の法規制薬物行政と取り締まりに直接的に貢献する内容であり、ひいては、国民の健康・危機リスクを軽減させるものと考えられる。

E. 健康危険情報
特になし。

F. 研究発表

【学会発表等】

1. 河村 麻衣子, 花尻(木倉)瑠理, 内山奈穂子, 最所 和宏, 緒方 潤, 合田幸広, 袴塚高志: 薬毒物試験法 II-6. 大麻試験法 6・2 カンナビノイド受容体作動薬 2. アミノア

ルキルインドール類(ナフトイルインドール類), 日本薬学会第 134 年会(2014.3, 熊本).

2. 内山奈穂子, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚高志: 簡易薬物スクリーニングキットを用いた合成カンナビノイドの識別法の検討 第 36 回日本中毒学会(2014.7.発表予定)
3. 永井智紀, 花尻(木倉)瑠理, 菅野さな枝, 鷲盛久, 千葉正悦, 竹下裕史, 高田女里, 河村麻衣子, 合田幸広, 向井敏二: いわゆる「脱法ハーブ」吸入による急死の一例検例, 日本法医学会(2013. 6, 札幌).
4. R. Kikura-Hanajiri, M. Kawamura, S. Kanno, T. Nagai, M. Takada, T. Mukai and Y. Goda: Determination of MAM-2201 and its metabolites in a fatal case and the binding affinities of MAM-2201 at the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. 51th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT 2013) (2013. 9, Funchal, Portugal).
5. S. Kanno, R. Kikura-Hanajiri, M. Sagi, T. Nagai, S. Chiba, H. Takeshita, M. Takada, M. Kawamura, Y. Goda, T. Mukai: A fatal case after smoking herb containing a synthetic cannabinoid MAM-2201. 51th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT 2013) (2013. 9, Funchal, Portugal).
6. 緒方 潤, 内山奈穂子, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広, 袴塚高志, 法規制植物の LAMP を用いた簡易検出法の検討 日本薬学会第 134 年会(2014.3, 熊本)

分担研究課題:法規制薬物(植物を含む)の分析と鑑別に関する研究
分担研究者:花尻(木倉)瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

—アミノアルキルインドール(ナフトイルインドール)構造を有する麻薬の分析法について—

研究要旨: ナフトイルインドール骨格を有するカンナビノイド受容体作動薬のうち、2012年及び2013年度に麻薬として規制されたJWH-122, AM2201, MAM-2201及びそれらと類似の構造を有する指定薬物6化合物を対象として、薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー/質量分析、高速液体クロマトグラフィー/質量分析による試験法をまとめた。なお、本試験法は、日本薬学会環境衛生化学部会薬毒物試験法委員会に「II-6. 大麻試験法 6・2 カンナビノイド受容体作動薬 2 アミノアルキルインドール類(ナフトイルインドール類)」として提出したものであり、委員会において審議された後、日本薬学会第134年会において試験法案として提示された。

研究協力者

河村 麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部

A. 研究目的

近年、医薬品開発途上でメデイシナルケミストリーによって大量に誕生した、特定の受容体に対し高い活性を有する化合物が違法ドラッグ市場に次々と新たに登場している。特に、乾燥植物細片にカンナビノイド受容体作動薬を混合した、いわゆる「脱法ハーブ」と呼ばれる製品による健康被害が社会問題となっている。これら化合物は、規制されると代わりに構造類似体が出現するため、規制との「いたちごっこ」的状况が続いている。2013年3月には、カンナビノイド受容体作動薬のうち、ナフトイルインドール構造に特定の置換基を有する化合物群が、薬事法における指定薬物として包括的に規制された。

アミノアルキルインドール類の主代謝経路は、*N*-アルキル側鎖、ナフトレン環もしくはインドール環上における水酸化、さらに酸化が進んだ*N*-アルキル側鎖のカルボン酸化である¹⁾。JWH-018に

おいては、JWH-018 *N*-5-アルキル水酸化体、JWH-018 *N*-ペンタン酸、さらにJWH-018 *N*-4-アルキル水酸化体の各グルクロン酸抱合体がヒト尿中から主代謝物として検出される²⁾⁴⁾。一方、JWH-018の*N*-アルキル側鎖末端にフルオロ基を有するAM2201では、代謝過程で酸化的脱ハロゲン化が生じ、JWH-018と同じ代謝物であるJWH-018 *N*-5-アルキル水酸化体及びJWH-018 *N*-ペンタン酸がヒト尿中から主代謝物として検出され、AM2201 *N*-4-アルキル水酸化体がマイナー成分として検出される⁴⁾。従って、JWH-018とAM2201の摂取識別には、JWH-018に特異的な代謝物であるJWH-018 *N*-4-アルキル水酸化体の検出の有無が重要となる。

MAM-2201は、2012年初頭に初めて日本国内において違法ドラッグ製品から検出されたが、その後急速に全国に流通が広がり、死亡事例を含む健康被害が報告された⁵⁾⁶⁾。また、海外においても本化合物による健康被害が報告された⁷⁾。JWH-018, JWH-122, AM2201, JWH-019, JWH-210, JWH-213については、主に中枢神経系において大麻様作用の発現に関与するとされ

るカンナビノイド CB₁ 受容体に対して強い親和性を示すことが報告されており、大麻の主活性成分 Δ⁹-THC と比較して、約 4~90 倍の値を示す⁸⁾⁻¹¹⁾。

本報告では、ナフトイルインドール骨格を有するカンナビノイド受容体作動薬のうち、2012 年及び 2013 年度に麻薬として規制された JWH-018, JWH-122, AM2201, MAM-2201 及びそれらと類似の構造を有する指定薬物 6 化合物を対象として、薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー/質量分析、高速液体クロマトグラフィー/質量分析による測定法をまとめた。

B. 研究方法

1. 分析対象化合物

下記の化合物について検討を行った(図 1)。いずれの化合物も、Cayman 社製(Ann Arbor, Michigan, USA)を使用した。

- 1) JWH-018: (ナフタレン-1-イル)(1-ペンチル-1*H*-インドール-3-イル)メタノン
- 2) JWH-122: (4-メチルナフタレン-1-イル)(1-ペンチル-1*H*-インドール-3-イル)メタノン
- 3) AM2201: [1-(5-フルオロペンチル)-1*H*-インドール-3-イル](ナフタレン-1-イル)メタノン
- 4) MAM-2201: [1-(5-フルオロペンチル)-1*H*-インドール-3-イル](4-メチルナフタレン-1-イル)メタノン
- 5) JWH-019: (1-ヘキシル-1*H*-インドール-3-イル)(ナフタレン-1-イル)メタノン
- 6) JWH-210: (4-エチルナフタレン-1-イル)(1-ペンチル-1*H*-インドール-3-イル)メタノン
- 7) JWH-213: (4-エチルナフタレン-1-イル)(2-メチル-1-ペンチル-1*H*-インドール-3-イル)メタノン
- 8) JWH-122 *N*-(4-pentenyl) analog: (4-メチルナフタレン-1-イル)[1-(ペンチン-4-エン-1-イル)-1*H*-インドール-3-イル]メタノン
- 9) EAM-2201: (4-エチルナフタレン-1-イル)[1-(5-フルオロペンチル)-1*H*-インドール-3-イル]メタノン

10) 4-MeO-AM2201: [1-(5-フルオロペンチル)-1*H*-インドール-3-イル](4-メトキシナフタレン-1-イル)メタノン

2. 定性試験

以下の試験は、各化合物標品のメタノール溶液を使用した。

2-(1) 薄層クロマトグラフィー(TLC)

[試薬] ① シリカゲルプレート(蛍光剤入り)は Silica gel 60F₂₅₄, 20 cm x 20 cm (Merck 社製)を使用した。

② 展開溶媒

i) トルエン-ヘキサン-ジエチルアミン(25 : 10 : 1), ii) アセトン-トルエン-28%アンモニア水(20 : 10 : 1), iii) ヘキサン-酢酸エチル-28%アンモニア水(30 : 10 : 1), iv) ヘキサン-酢酸エチル(3 : 1), v) ヘキサン-アセトン(4 : 1)。

③ 検出試薬: i) マルキス試液, ii) ドラーゲンドルフ-2 試液, iii) 10%硫酸噴霧後加熱。

[試験溶液の調製] 試料に少量のメタノールを加えて攪拌し、超音波処理後、遠心分離を行う。遠心分離後の上清を試験溶液とする。

④ 試験法: 各呈色試薬の検出限界は、各濃度の化合物を薄層プレート上にスポットし、展開を行わずに試薬を噴霧し呈色の確認を行った。

[試験操作] 常法により展開したのち風乾し、紫外線(254 nm)を照射してスポットの状態を観察したのち、各種検出試薬を噴霧し、発色状態を観察する。R_f 値および呈色を同時に展開した標準品と比較して同定する。

2-(2) ガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)

[装置] ガスクロマトグラフ/質量分析計(電子イオン化)

[試験溶液の調製] 試料に少量のメタノールを加えて攪拌し、超音波処理後、遠心分離を行う。遠心分離後の上清の一部を窒素気流下、蒸発乾固し、得られた残渣を酢酸エチルに再溶解したものを試験溶液とする。

[試験操作] 試験溶液の 1~2 μl をガスクロマトグ

ラフ/質量分析計に注入する。得られたクロマトグラムおよび質量スペクトルを標準品と比較して同定する。

ガスクロマトグラフィー/質量分析の条件

カラム:DB-5MS(Agilent社)(0.25 mm i.d.×30 m, 膜厚 0.25 μm)

カラム温度:80℃(1 min), 80~320℃(10℃/min 昇温, 10 min 保持)

注入口温度:250℃

キャリアーガスおよび流速:He, 1.0 ml/min

イオン源温度:200℃

イオン化電圧:70 eV

注入法:スプリットレス(試料導入時間 1 min)

2-(3) 高速液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)

[装置] 高速液体クロマトグラフ/質量分析計

[試験溶液の調製] 試料に少量のメタノールを加えて攪拌し, 超音波処理後, 遠心分離を行う。遠心分離後の上清の一部をフィルター(0.45 μm)でろ過したものを試験溶液とする。

[試験操作] 試験溶液の 2~10 μl を高速液体クロマトグラフに注入する。得られたクロマトグラムおよび質量スペクトルを標準品と比較して同定する。

高速液体クロマトグラフィー/質量分析の条件

カラム: L-column 2 ODS(化学物質評価研究機構製)(1.5 mm i.d.×150 mm, 粒径 5 μm)

移動相: A 液;10 mmol/l ギ酸アンモニウム水溶液(pH 3.5) - アセトニトリル(50:50), B 液;10 mmol/l ギ酸アンモニウム水溶液(pH 3.5) - アセトニトリル(5:95)

流速: 0.10 ml/min

カラム温度:40℃

PDA 検出器:UV 210~450 nm

イオン化法:エレクトロスプレーイオン化(ESI) ポジティブ

キャピラリー電圧:40 V

グラジエントの条件

min	A (%)	B (%)
0	100	0
15	0	100
25	0	100

3. 定量試験

(3)-1 高速液体クロマトグラフィー

[装置] 高速液体クロマトグラフ:UV 検出器付き。

[試験溶液の調製] 試料をメタノールに溶解したのち, フィルター(0.45 μm)でろ過したものを試験溶液とする。試料が液体の場合, メタノールで適当な濃度に希釈後, フィルターを通して不溶物を除去したのち, 同様に操作できる。

[試験操作] 試験溶液 1~5 μl を高速液体クロマトグラフに注入する。標準品のメタノール溶液をメタノールで希釈して同様に注入し, 作成した検量線により定量する。本法は絶対検量線を用いた定量法である。

高速液体クロマトグラフィーの条件

カラム, 移動相, 流速およびカラム温度は定性試験(1)-3 に準じる。なお, 質量分析計への接続を考慮し, 緩衝液としてギ酸アンモニウムを用いる。

検出器: UV 検出器(310 nm)

(3)-2 高速液体クロマトグラフィー/質量分析

[装置]および高速液体クロマトグラフィー/質量分析の条件は, 定性試験(1)-3 に準じる。[試験溶液の調製]および[試験操作]は, 定量試験(2)-1 に準じて行う。

C. 結果・考察

1. TLC

検討した5種類の展開溶媒における10化合物のUV検出によるR_f値を表1に示す。また, 4種類の検出試薬及びUVにおける検出限界(μg)とそれら色調を表2に示す。

TLC分離において、大麻成分 Δ^9 -THC の分離に汎用される展開溶媒 i) トルエン-ヘキサン-ジエチルアミン(25 : 10 : 1)を用いた場合、ナフトイルインドール類のスポットがテーリングを起こした。そこで、展開溶媒 iv), v)では中性条件の展開溶媒を用いて検討を行った。i) から v) のいずれの展開溶媒でも、JWH-018 と JWH-122, AM-2201とMAM-2201など、構造が極めて類似している化合物については、明確な分離が困難であったが、ヘキサン-酢酸エチルを用いた展開溶媒 iii) 及び iv) においては、比較的良好な結果が得られた。

一方、検出に関しては、いずれの化合物も UV で比較的高感度に検出が可能であった。また、10%硫酸噴霧後加熱する方法及びマルキス試薬においても、UVと同等に高感度の検出が可能であった。ただし、マルキス試薬において、4-MeO-AM-2201 では、検出限界が 1 μg と他化合物よりも低感度であった。ドラーゲンドルフ試薬においては、いずれの化合物においても検出限界が 5 μg と低感度であった。今回検討した 10 化合物においては、それぞれの呈色試薬で、特徴的な色調を認めることはできなかった。

なお、呈色試薬 Fast Blue BB はカンナビノイド特異的な検出試薬であり、カンナビシクロヘキサノールや CP-47,497 など一部のカンナビノイド受容体作動薬は、カンナビノイド特異的な検出試薬 Fast Blue B により発色が確認される¹²⁾。しかし、今回検討したナフトイルインドールタイプのカンナビノイド受容体作動薬では、すべての化合物で発色が認められなかった。

2. GC-MS

分析対象とした 10 種類のナフトイルインドール類の GC 分離における保持指標を表 3 に示した。また、各化合物の全イオンクロマトグラムおよびマスクロマトグラムを図 2 に、マススペクトルを図 3 に記載した。いずれの化合物においても、GC-MS 分析時における熱分解は観察されず、微極性キャピラリーカラム DB-5MS を用いた分離条件で、一

部を除きおおむね良好に分離した。JWH-122 及び JWH-122 *N*-(4-pentenyl) analog については、DB-5MS では良好な分離は困難であったが、DB-1MS などの無極性カラムを用いれば、分離が可能であった。今回分析対象としたナフトイルインドール類は、いずれも GC-EI-MS 分析において、ベースピークが分子イオン $[M]^+$ であり、カルボニル由来のヒドロキシラジカルが脱離した $[M^+-17]$ 等¹³⁾、構造由来のフラグメントイオンが多数検出された。

なお、違法ドラッグ製品中には、複数の種類の化合物が混在することが多い。本試験法では、最終的に酢酸エチルに再溶解したものを試験溶液としているが、フェネチルアミン誘導体の塩など、混在する化合物によっては酢酸エチルに再溶解されず、検出されにくくなる場合があるため、注意が必要である。

3. LC-MS

分析対象とした 10 種類のナフトイルインドール類の LC-PDA-MS 分析における UV (310 nm) クロマトグラム及び ESI-ポジティブモードにおけるマスクロマトグラムを図 4 に、各化合物のマススペクトルおよび UV スペクトルを図 5 に記載した。ODS カラム(L-column 2 ODS, 化学物質評価研究機構製, 1.5 mm i.d.×150 mm, 粒径 5 μm)を用いた、ギ酸-アセトニトリルを移動相としたグラジエント分析条件において、分析対象化合物のピークトップ分離が可能であった。ナフトイルインドール類は脂溶性が高く、ODS カラムに強く保持されるため、グラジエント分析が推奨された。いずれの化合物も、本分析条件で、プロトン付加分子が主に検出された。また、UV スペクトルにおいて、312 nm 付近に吸収極大を示し、240 から 250 nm 付近に小さな吸収の肩を示したが、4-MeO-AM2201 については吸収の肩は示さなかった。JWH-122 *N*-(4-pentenyl) analog と JWH-018, また JWH-122 と JWH-019 は、本分析条件ではピークトップ分離は可能であったが、ベースライン分離は困難であった。特に、JWH-122 と JWH-019 は、プロトン付

加分子が同じ値 m/z 356 を示すことから、識別には注意が必要であると思われた。

D. 結論

ナフトイルインドール骨格を有するカンナビノイド受容体作動薬のうち、2012年及び2013年度に麻薬として規制された JWH-122, AM2201, MAM-2201 及びそれらと類似の構造を有する指定薬物6化合物を対象として、薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー／質量分析、高速液体クロマトグラフィー／質量分析による試験法をまとめた。なお、本試験法は、日本薬学会 環境衛生化学部会 薬毒物試験法委員会に「II-6. 大麻試験法 6・2 カンナビノイド受容体作動薬 2. アミノアルキルインドール類(ナフトイルインドール類)」として提出したものであり、委員会において審議された後、日本薬学会第134年会において試験法案として提示された。

E. 参考文献

- 1) Hutter, M., *et al.*, *J. Mass Spectrom.*, **47**, 54 (2012).
- 2) Moran, C. L., *et al.*, *Anal. Chem.*, **83**, 4228 (2011).
- 3) Chimalakonda, K. C., *et al.*, *Anal. Chem.*, **83**, 6381 (2011).
- 4) Chimalakonda, K. C., *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 2174 (2013).
- 5) Saito, T., *et al.*, *Forensic Toxicol.*, **31**, 331 (2013).
- 6) 花尻(木倉)瑠理ら, 日本薬学会第133年会講演要旨集 29pmE-111 (2013).
- 7) Derungs, A., *et al.*, *Forensic Toxicol.*, **31**, 164 (2013).
- 8) Aung, M. M., *et al.*, *Drug Alcohol Depend.*, **60**, 133 (2000).
- 9) Huffman, J. W., *et al.*, *Bioorg Med Chem Lett.*, **11**, 539 (2003).
- 10) Huffman, J. W., The cannabinoid receptors.

Humana Press, New York, p. 49 (2009).

- 11) Makriyannis, A., Deng, H., WO patent 200128557, "Cannabimimetic indole derivatives", granted 2001-06-07 (2001).
- 12) 桑山健次ら, 法科学技術, **18**, 143 (2013).
- 13) 財津桂ら, 法科学技術, **16**, 73 (2011).

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

1. 河村 麻衣子, 花尻(木倉)瑠理, 内山奈穂子, 最所 和宏, 緒方 潤, 合田幸広, 袴塚高志: 薬毒物試験法 II-6. 大麻試験法6・2 カンナビノイド受容体作動薬 2. アミノアルキルインドール類(ナフトイルインドール類), 日本薬学会第134年会 (2014.3, 熊本).

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

表1 TLCにおけるナフトイルインドール類のR_f値

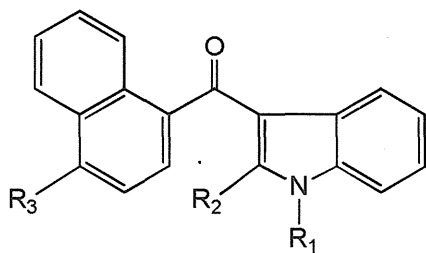
化合物	R _f 値 展開溶媒				
	i)	ii)	iii)	iv)	v)
JWH-018	0.35	0.85	0.71	0.46	0.37
JWH-122	0.35	0.85	0.74	0.49	0.37
AM2201	0.25	0.83	0.46	0.29	0.25
MAM-2201	0.26	0.84	0.50	0.31	0.27
JWH-019	0.34	0.86	0.73	0.48	0.37
JWH-210	0.35	0.87	0.77	0.51	0.40
JWH-213	0.32	0.87	0.75	0.48	0.41
JWH-122 <i>N</i> -(4-pentenyl) analog	0.32	0.85	0.67	0.43	0.35
EAM-2201	0.29	0.85	0.59	0.34	0.30
4-MeO-AM2201	0.24	0.83	0.37	0.21	0.22

表2 呈色反応における各検出試薬の検出限界(μg)と色調

化合物	検出試薬			
	i)	ii)	iii)	UV
JWH-018	0.5 (黄褐色)	5 (薄橙色)	0.5 (薄黄色)	0.5
JWH-122	0.5 (黄褐色)	5 (薄橙色)	0.5 (薄黄色)	0.5
AM2201	0.5 (黄褐色)	5 (薄橙色)	0.5 (薄黄色)	0.5
MAM-2201	0.5 (黄褐色)	5 (薄橙色)	0.5 (薄黄色)	0.5
JWH-019	0.5 (黄褐色)	5 (薄橙色)	0.5 (薄黄色)	0.5
JWH-210	0.5 (黄褐色)	5 (薄橙色)	0.5 (薄黄色)	0.5
JWH-213	0.5 (黄褐色)	5 (薄橙色)	0.5 (薄黄色)	0.5
JWH-122 <i>N</i> -(4-pentenyl) analog	0.5 (黄褐色)	5 (薄橙色)	0.5 (薄黄色)	0.5
EAM-2201	0.5 (黄褐色)	5 (薄橙色)	0.5 (薄黄色)	0.5
4-MeO-AM2201	1 (黄褐色)	5 (薄橙色)	0.5 (濃黄色)	0.5

表3 ナフトイルインドール類のGC分析における保持指標

化合物名	保持指標
JWH-018	3260
JWH-122	3396
AM2201	3369
MAM-2201	3506
JWH-019	3348
JWH-210	3451
JWH-213	3489
JWH-122 <i>N</i> -(4-pentenyl) analog	3392
EAM-2201	3562
4-MeO-AM2201	3650



化合物名	分子量	R1	R2	R3
JWH-018	341	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	H	H
JWH-122	355	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	H	CH ₃
AM2201	359	<i>n</i> -C ₅ H ₁₀ F	H	H
MAM-2201	373	<i>n</i> -C ₅ H ₁₀ F	H	CH ₃
JWH-019	355	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	H	H
JWH-210	369	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	H	C ₂ H ₅
JWH-213	383	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	CH ₃	C ₂ H ₅
JWH-122 <i>N</i> -(4-pentenyl) analog	353	<i>n</i> -C ₅ H ₉	H	CH ₃
EAM-2201	387	<i>n</i> -C ₅ H ₁₀ F	H	C ₂ H ₅
4-MeO-AM2201	389	<i>n</i> -C ₅ H ₁₀ F	H	OCH ₃

図1 分析対象としたアミノアルキルインドール類(ナフトイルインドール類)の構造

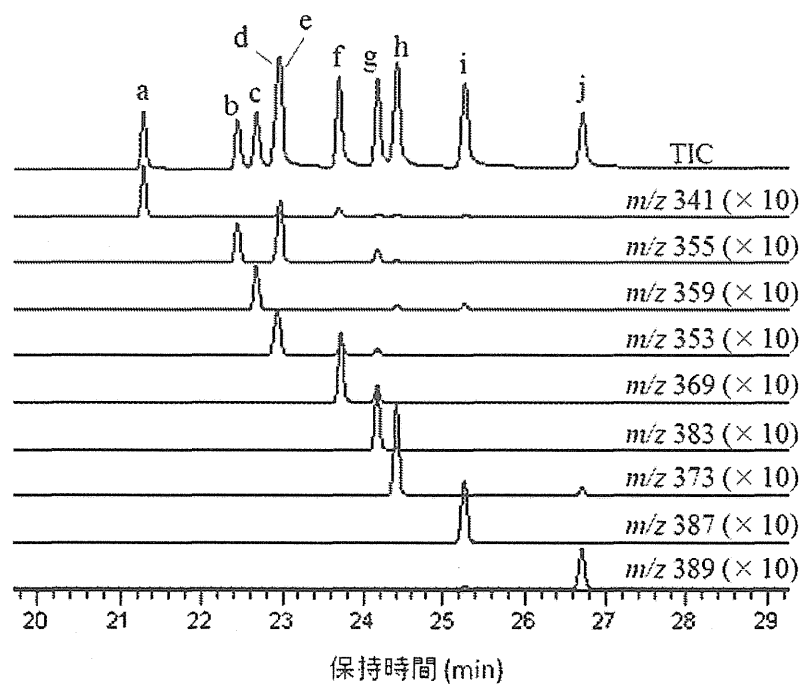


図2 ナフトイルインドール類の全イオンクロマトグラムおよびマスクロマトグラム
 (a) JWH-018, (b) JWH-019, (c) AM2201, (d) JWH-122 *N*-(4-pentenyl) analog, (e) JWH-122
 (f) JWH-210, (g) JWH-213, (h) MAM-2201, (i) EAM-2201, (j) 4-MeO-AM2201